



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|---|-----------|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁴ : C12N 7/02, C12M 3/00 | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 89/ 08701 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 21. September 1989 (21.09.89) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP89/00245 (22) Internationales Anmeldedatum: 9. März 1989 (09.03.89) (31) Prioritätsaktenzeichen: P 38 08 129.6 P 38 33 925.0 (32) Prioritätsdaten: 11. März 1988 (11.03.88) 5. Oktober 1988 (05.10.88) (33) Prioritätsland: DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR ANGEWANDTE BIOTECHNOLOGIE DER TROPEN AN DER GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT [DE/DE]; Kellnerweg 6, D-3400 Göttingen (DE). (72) Erfinder;und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : SEIFERT, Horst, S., H. [DE/DE]; Heinrich-Deppe-Ring 28, D-3406 Bovenden (DE). BÖHNEL, Helge [DE/DE]; Birkenweg 2a, D-3406 Bovenden (DE). ROTH, Frauke [DE/DE]; Kookweg 5, D-3403 Friedland (DE). | | (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Möhlstraße 22, D-8000 München 80 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> |
| (54) Title: PROCESS AND DEVICE FOR PRODUCING VIRUSES AND VIRAL ANTIGENS (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON VIRUS UND VIRALEM ANTIGEN UND VORRICHTUNG HIERZU (57) Abstract <p>Viruses or viral antigens are obtained by culturing animal cells in a nutrient medium suspension. The animal cells are cultured in a first bioreactor (A) under continuous addition of nutrient medium in suspension. When a given cell concentration is reached, the cell suspension is transferred to a second bioreactor (B) where it is used as the nutrient medium for culturing the virus under continuous addition of a conservation medium. When a given quantity of virus is produced, the cells and cell residues are continuously separated from the virus-containing nutrient medium suspension in a first filtration arrangement and the residue is discarded. The virus or viral antigen and nutrient medium suspension in the filtrate are continuously separated in a second filtration arrangement. The virus or viral antigen are concentrated and the nutrient medium is discarded.</p> (57) Zusammenfassung <p>Zur Herstellung von Virus oder viralem Antigen durch Kultur auf tierischen Zellen in Nährmedium-Suspension kultiviert man in einem ersten Bioreaktor (A) die tierischen Zellen unter kontinuierlicher Nährmediumzugabe in Suspension, überführt nach Erreichen einer bestimmten Zellkonzentration die Zellsuspension in einen zweiten Bioreaktor (B) kontinuierlich und verwendet sie dort als Nährboden für die Viruszüchtung unter kontinuierlicher Zugabe eines Erhaltungsmediums, trennt nach Erzeugung einer bestimmten Menge an Virus in einer ersten Filtrationsanordnung Zellen und Zellreste von der virushaltigen Nährmediumsuspension kontinuierlich ab, verwirft das Retentat, trennt im Filtrat in einer zweiten Filtrationsanordnung Virus oder virales Antigen von der Nährmediumsuspension kontinuierlich, konzentriert dabei auf und verwirft das Nährmedium.</p> | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AT | Österreich | FR | Frankreich | MR | Mauritanien |
| AU | Australien | GA | Gabun | MW | Malawi |
| BB | Barbados | GB | Vereinigtes Königreich | NL | Niederlande |
| BE | Belgien | HU | Ungarn | NO | Norwegen |
| BG | Bulgarien | IT | Italien | RO | Rumänien |
| BJ | Benin | JP | Japan | SD | Sudan |
| BR | Brasilien | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KR | Republik Korea | SN | Senegal |
| CG | Kongo | LI | Liechtenstein | SU | Soviet Union |
| CH | Schweiz | LK | Sri Lanka | TD | Tschad |
| CM | Kamerun | LU | Luxemburg | TG | Togo |
| DE | Deutschland, Bundesrepublik | MC | Monaco | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| DK | Dänemark | MG | Madagaskar | | |
| FI | Finnland | ML | Mali | | |

Verfahren zur Herstellung von Virus und viralem Antigen und Vorrichtung hierzu

B e s c h r e i b u n g

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Virus oder viralem Antigen durch Kultur auf tierischen Zellen in Nährmedium-Suspension, sowie eine Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens.

Zur Züchtung von Virus- und Chlamydienarten kann bis heute eine Kultur in Suspension nur in Rollerflaschen oder in statischen Fermenterkulturen durchgeführt werden. Hierzu müssen bei Zellkulturen im statischen Fermenter umständliche Vorbereitungen getroffen werden, bis die Kultur im großen Volumen gelingt und diese Kulturen haben weiter den Nachteil, daß jeweils nach erfolgter Kultur, nach jedem sogenannten "batch", das System gereinigt und erneut angefahren werden muß. Eine eventuelle Kontamination eines Großfermenters bedeutet überdies den Verlust von großen Mengen an Nährmedium.

Kontinuierliche Kulturen tierischer Zellen können bisher nur zur Züchtung von genetisch manipulierten produkt-produzierenden Zellen (Interferon, monoklonale Antikörper) eingesetzt werden.

Ein weiteres Problem bei der Züchtung von Viren zur Herstellung von Virusvakzinen ist, daß die gängigen Filtrationen zur Abtrennung der Zellreste nicht niedermolekulare Bestandteile beseitigen, die besonders bei Wiederholungsimpfungen zu schweren allergischen Erscheinungen führen können. Es bestand daher ein Bedarf an einem Verfahren zur Züchtung von Viren, das die Nachteile einer "batch"-weisen Betriebsart vermeidet, und durch das es weiter gelingt, niedermolekulare Bestandteile von Virus zu trennen und auch die Gefahr einer Kontamination zu minimieren.

Aufgabe der Erfindung war es daher, ein Züchtungsverfahren für Viren oder virale Antigene bereitzustellen, das leicht zu handhaben ist, und bei dem eine Kontamination praktisch ausgeschlossen werden kann.

Gelöst wird die Aufgabe durch ein Verfahren zur Herstellung von Virus oder viralem Antigen durch Kultur auf tierischen Zellen in Nährmediumsuspension, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man in einem ersten Bioreaktor A die tierischen Zellen unter kontinuierlicher Nährmediumzugabe in Suspension kultiviert, nach Erreichen einer bestimmten Zellkonzentration die Zellsuspension in einen zweiten Bioreaktor B kontinuierlich überführt und dort als Nährboden für die Viruszüchtung unter kontinuierlicher Zugabe eines Erhaltungsmediums verwendet, nach Erzeugung einer bestimmten Menge an Virus in einer ersten Filtrationsanordnung Zellen und Zellreste von der virushaltigen Nährmediumsuspension kontinuierlich abtrennt, das Retentat verwirft, im Filtrat in einer zweiten Filtrationsanordnung Virus oder virales Antigen von der Nährmediumsuspension kontinuierlich trennt und dabei aufkonzentriert und das verbrauchte Nährmedium verwirft.

Bevorzugte Ausführungsformen dieses Verfahrens sind in den Unteransprüchen aufgeführt.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird es ermöglicht, eine kontinuierliche Viruszüchtung durchzuführen, bei der eine Zellkultur gezüchtet wird, diese als Wachstumsgrundlage für die zu züchtenden Viren verwendet wird, und über zwei Filtrationsstufen Virus zuerst von Zell-

resten, und dann auch von niedermolekularen Bestandteilen getrennt werden kann. Die Steuerung der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen erfolgt im Bioreaktor A, d.h. in der Zellkultur über Zugabe der Nährmediumsuspension, was vorzugsweise rechnergesteuert erfolgt. Die Steuerung sowohl dieser Nährmedium-Suspensionszugabe, als auch der Flußgeschwindigkeit von tierischen Zellen in Nährmediumsuspension in den zweiten Bioreaktor B erfolgt über photometrische Messung der Dichte der Zellsuspension bei der Überleitung in den Bioreaktor B. Hat die Zellsuspension noch keine ausreichende Zelldichte erreicht, so wird die Durchflußgeschwindigkeit zwischen dem Bioreaktor A und B gedrosselt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die Zellen bei einer Konzentration von mindestens 4×10^5 Zellen und vorzugsweise 2×10^6 Zellen pro ml kontinuierlich in den Bioreaktor B überführt. Liegt die Zellkonzentration unter diesem Wert, wird daher in der bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die Flußgeschwindigkeit von Bioreaktor A nach Bioreaktor B entsprechend verringert, so daß die Zellen zu einer höheren Dichte anwachsen können, bevor sie in den Bioreaktor B überführt werden.

Im zweiten Bioreaktor B, der mit einer Viruspräparation angeimpft wird, erfolgt sodann die Züchtung von Virus, das sich in den tierischen Zellen vermehren kann. Nach Vermehrung von Virus, das einen cytopathischen Effekt ausübt, in diesen Zellen, wird die Zelle lysiert und dabei die Tochterviren freigesetzt. Hierdurch wird eine meßbare Abnahme der Zelldichte und dadurch eine Aufhellung der Suspension im Bioreaktor B bewirkt, die ebenfalls beim Weiterleiten der Zell-Virus-Suspension aus dem Bioreaktor B in die erste Filtrationsanordnung in einem Photometer als cytopathischer Effekt gemessen und

und dadurch die Flußgeschwindigkeit vom Bioreaktor B in die erste Filtrationsanordnung ebenfalls optimal gesteuert werden kann. Die Überführung der Virussuspension, die auch noch nicht infizierte Zellen und auch Zelltrümmer von lysierten Zellen enthält, in die erste Filtrationsanordnung, erfolgt ebenfalls kontinuierlich. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgen die Filtrationsschritte, d.h. wird Zell-Virus-Suspension aus dem Bioreaktor B in die erste Filtrationsanordnung überführt, sobald im Bioreaktor B mindestens 80% der Zellen lysiert sind.

Bei der Züchtung von Viren, die keinen cytopathischen Effekt zeigen, werden die aus dem Bioreaktor B entnommenen Zellen durch Ultraschall zerstört und das darin befindliche Virus freigesetzt.

Hierzu läuft vorzugsweise aus dem Fermenter B kontinuierlich die mit Virus infizierte Zellsuspension in ein Sammelgefäß. Nach einer durch Vorversuche zu bestimmten Zeit (ca. 15 Minuten) wird die Ultraschallquelle eingeschaltet, die nach Zeit und Intensität regelbar alle Zellen zerstört. Anschließend wird die so erhaltene Suspension in die erste Filtrationsanordnung geleitet und das Sammelgefäß geleert. Die Zeitsteuerung erfolgt durch den zentralen Rechner.

Die Verweildauer in Bioreaktor B muß in Vorversuchen ermittelt werden. Bei kontinuierlichem Zufluß aus Bioreaktor A läßt sich die Verweildauer in Bioreaktor B durch Veränderung des in Bioreaktor B befindlichen Arbeitsvolumen variieren.

Für die Viruszüchtung wird in den Bioreaktor B zur Aufrechterhaltung guter Wachstumsbedingungen für die Zellen kontinuierlich ein Erhaltungsmedium zugegeben, das die Wachstumsbedingungen optimiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die Retentate der ersten und/oder zweiten Filtrationsanordnung mit einer Waschflüssigkeit gewaschen, die als Filtrat in der zweiten Filtrationsanordnung dem Virusprodukt entzogen und verworfen wird. Hierdurch wird in der ersten Filtrationsanordnung eine Erhöhung der Ausbeute an Virus erreicht, in der zweiten Filtrationsanordnung dagegen die Abtrennung von niedermolekularen Substanzen optimiert.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Konzentration der Zellen im Bioreaktor A und/oder die Menge der lysierten Zellen im Fall von cytopathisch wirkenden Viren über die Konzentration der noch intakten Zellen im Bioreaktor B durch photometrische Messung bestimmt und die Zugabe von Nährmedium zum Bioreaktor A, der Zulauf von Bioreaktor A zu Bioreaktor B, die Zugabe von Erhaltungsmedium zum Bioreaktor B, der Zulauf von Bioreaktor B in die erste Filtrationsanordnung oder/und die Zugabe von Waschflüssigkeit zu den Retentaten der Filtrationsanordnungen über einen Rechner gesteuert, an den die Photometer angeschlossen sind.

Bevorzugt werden in den Filtrationsanordnungen Hohlfaserbündel als Filter im Überstromverfahren verwendet. In weiteren bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung wird das Nährmedium vor der Zugabe zu Bioreaktor A, das Erhaltungsmedium vor Zugabe zu Bioreaktor B, sowie die

Waschflüssigkeit vor Zugabe zu den Retentaten der Filtrationsanordnungen tangential über Hohlfaserbündel im Überstrom steril filtriert. Hierdurch wird eine Kontamination der Kulturen wirksam vermieden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der pH und der pO_2 in den Bioreaktoren über Begasung durch Hohlfasermembranen gesteuert. Derartige Hohlfasern zur blasenfreien Begasung sind beispielsweise aus J. Lehmann et al., BTF-Biotech-Forum 2 (1985)3 bekannt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die zur pH- und pO_2 -Regulierung verwendeten Gase in einem Gasmischgefäß rechnergesteuert gemischt und gemeinsam durch nur ein Hohlfasersystem zudosiert.

Die Züchtung von Zellen und Virus verläuft im erfindungsgemäßen Verfahren gekoppelt, wobei gezüchtete Zellen sofort weiter als Wachstumsgrundlage für Viren verwendet werden. Die gesamte Züchtung von Zellen und Viren läuft erfindungsgemäß kontinuierlich ab, wodurch die Nachteile einer ansatzweisen Viruszüchtung vermieden werden, da es nicht nach Beendigung eines Kultur-Zyklus nötig ist, das System neu zu beladen und erneut anzufahren. Sobald das erfindungsgemäße Viruszüchtungsverfahren angelaufen ist, kann es ohne Unterbrechungen über lange Zeiträume, zumindest über Wochen, ohne Kontamination verwendet werden, wobei aufgrund der bevorzugt eingebauten Leitreechnersteuerung kontinuierlich kein besonders ausgebildetes Personal nötig ist und ein homogenes Produkt erhalten wird, dessen Wirksamkeit garantiert ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens zur kontinuierlichen Züchtung von Virus oder viralem Antigen durch Kultur auf tierischen Zellen in Nährmediumsuspension, die dadurch gekennzeichnet ist, daß ein Bioreaktor A, der über eine Leitung mit Nährmedium-Vorratsbehältern und über eine Leitung, welche mit einem Photometer ausgerüstet ist, mit einem Bioreaktor B verbunden ist, der über eine Leitung mit Erhaltungsmediumbehältern verbunden ist und der weiter über eine Leitung mit einem ersten Retentatbehälter verbunden ist, aus dem die Zell-Virus-Suspension über eine Leitung über eine erste Filtrationseinrichtung geleitet wird, deren Retentat über eine Leitung zurück in den ersten Retentatbehälter geführt wird und aus dem ersten Retentatbehälter über eine Leitung aus dem System abgezogen wird, und deren Filtrat über eine Leitung in einen zweiten Retentatbehälter geführt wird, der über eine Leitung mit einer zweiten Filtrationseinrichtung verbunden ist, deren Retentat über eine Leitung zurück in den zweiten Retentatbehälter geführt wird und aus dem System über eine Leitung abgezogen wird und deren Filtrat über eine Leitung abgezogen wird, wobei die Photometer und mit einem rechner-gesteuerten Kontrollsystem verbunden sind.

In einer ersten bevorzugten Ausführungsform ist hierbei auch die Leitung von Bioreaktor B in die erste Filtrationsanordnung mit einem Photometer ausgerüstet, das mit dem Kontrollsystem verbunden ist. Hierdurch wird eine erneute Zellkonzentrationmessung ermöglicht, woraus auf die gebildete Virusmenge geschlossen werden kann.

In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform ist diese Leitung zwischen dem Bioreaktor B und der ersten Filtrationsanordnung mit einem Sammelgefäß, das eine Ultraschallquelle enthält, und gegebenenfalls noch mit einer Pumpe ausgerüstet. Durch die Ultraschallanwendung werden - bei der Zucht von Viren, die keinen lytischen Effekt ausüben - die Zellen zerstört und die gezüchteten Viren freigesetzt. Aus dem Sammelgefäß wird die Suspension dann vorzugsweise über die Pumpe in den ersten Retentatbehälter geleitet.

In ebenfalls bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung sind die Zuleitungen aus den Nährmedium- und Erhaltungsmedium-Vorratsbehältern und/oder die Zuleitungen zu den Filtrationseinrichtungen mit Pumpen versehen, die besonders bevorzugt ebenfalls von dem rechner-gesteuerten Kontrollsystem gesteuert werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Bioreaktoren A und B der Vorrichtung mit Hohlfasermembranen versehen, über die der pH-Wert und pO_2 -Gehalt der Zellsuspension durch Zugabe von Gasen reguliert werden kann. Hierzu kann die Vorrichtung auch noch ein Mischgefäß für Gase enthalten, in dem Gase rechnergesteuert vermischt werden, und dann über das Hohlfasersystem dosiert werden. Es ist im Rahmen der Erfindung ebenfalls möglich, nicht zwei getrennte Hohlfasermembranen für die beiden Bioreaktoren einzusetzen, sondern ein verbundenes Hohlfasermembransystem in beiden Reaktoren zu verwenden.

In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Bioreaktoren A und B mit Magnetrührern ausgestattet, die ein entsprechendes Vermischen und Rühren in diesen Bioreaktoren bewirken.

Um eine Kontamination in der Vorrichtung zu vorliegenden Elementen zu vermeiden, sind die Leitungen zwischen dem Bioreaktor A und B, zwischen dem Bioreaktor B und dem ersten Retentatbehälter, zwischen dem ersten Retentatbehälter und dem zweiten Retentatbehälter, die Leitungen zur Abführung der Retentate, sowie zur Abführung von niedermolekularen Bestandteilen und Wasser und schließlich die Waschflüssigkeit-Zulaufleitungen in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung mit Rückwuchsfallen ausgestattet. Weiter sind bevorzugt die Bioreaktoren A und B über Leitungen mit Überdruckventilen ausgestattet, die in ein Abluftsicherheitsgefäß münden. Hierdurch können Druckunterschiede und Überdrucke, die durch Überleitung von Suspension, bzw. durch Einleitung von Gasen oder Medien entstehen, ausgeglichen werden. Das Abluftsicherheitsgefäß dient zur Reinigung der Abluft, so daß keine gefährdenden Viruspartikel entweichen können. Auch die Retentatbehälter verfügen in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung über Druckausgleichsleitungen, die ebenfalls in das Abluftsicherheitsgefäß münden. All diese Druckausgleichsleitungen sind bevorzugt mit Hohlfaserfiltern ausgerüstet, die bereits eventuell vorhandene Viruspartikel zurückhalten (bei Waschflüssigkeit noch keine Rückflußfallen). In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung sind die Retentatbehälter über je eine Leitung, die mit einer Pumpe versehen ist, mit einem Waschflüssigkeitsbehälter verbunden, über den Waschflüssigkeit in die Retentatbehälter eingeführt werden kann. Die hierfür verwendete Leitung ist in einer bevorzugten Ausführungsform ebenfalls mit Rückwuchsfallen versehen.

Die Hohlfasermembransysteme zur Begasung im Bioreaktor A und B können ebenfalls über Leitungen, und bevorzugt auch mit Hohlfaserfilter zur Abtrennung von eventuell vorhandenem Virus, mit dem Abluftsicherheitsgefäß verbunden sein.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren und die hierzu verwendbare erfindungsgemäße Vorrichtung wird es ermöglicht, auf einfache Weise kontinuierlich Virus oder virale Antigene, die zur Vakzinierung geeignet sind, kontinuierlich zu züchten, wobei dieses Verfahren auch von nur wenig ausgebildetem Personal durchgeführt werden kann und über Wochen hinweg zu einem homogenen Produkt führt. Das erfindungsgemäße Verfahren und die Vorrichtung ersparen aufgrund der kompakten Geräte den Bau großer Laboratorien mit dazugehöriger Infrastruktur. Das System eignet sich auch zum Einbau in vorfabrizierte Laborcontainer, die fertig ausgerüstet am beispielsweise tropischen Standort aufgestellt, nach Anschluß an die Versorgung sofort mit der Produktion beginnen können. Auf diese Weise können auch ad hoc in Problemgebieten bei Seuchenausbruch gegebenenfalls Vakzinen aus lokalspezifischen Erregerstämmen erzeugt werden. Dieser Vorteil ist insofern von Bedeutung, als Erreger zahlreicher tropischer Seuchen nicht in die Industrieländer verbracht werden dürfen und damit eine zentrale Vakzine-Produktion für den Weltbedarf in einem Industrieland unmöglich ist (Rinderpest, afrikanische Schweinepest, Blue Tongue Virus u.a.). Das erfindungsgemäß erhaltene Produkt ist systembedingt von hoher Qualität und Antigenität, frei von schädlichen Nebenprodukten (niedrigmolekulare Substanzen oder Zellreste) und kann mit nur niedrigen Kosten hergestellt werden.

Die Figur zeigt eine erfindungsgemäß bevorzugte Vorrichtung mit einem Bioreaktor A 2, in den gesteuert aus Nährmediumvorratsbehältern 4 über eine Leitung 6, die mit einer Pumpe 8 ausgerüstet ist, Nährmedium in den Bioreaktor A 2 eingeführt wird.

Der Bioreaktor A 2 ist hierbei weiter mit Hohlfasermembranen 58 ausgerüstet, über die Gase zur Regulierung des pH oder pO_2 eingeleitet werden können. Zusätzlich ist der Bioreaktor A 2 mit einem Magnetührer 62 und über eine Leitung 66, die ein Überdruckventil aufweist, mit dem Abluftsicherheitsgefäß 70 verbunden, wobei die Leitung einen Hohlfaserfilter 82 zum Zurückhalten eventuell vorhandener Viren aufweist. Der Bioreaktor A 2 ist über eine Leitung 10, die mit einem Photometer 12 und einer Rückwuchsfalle ausgerüstet ist, mit dem Bioreaktor B 14 verbunden, in den über eine Leitung 18, die mit einer Pumpe 20 und einer Rückwuchsfalle ausgerüstet ist, aus den Behältern für Erhaltungsmedium 16 Medium zum Bioreaktor B 14 zugeführt wird. Weiter ist der Bioreaktor B 14 mit einer Hohlfasermembran 60 ausgerüstet, die zur Begasung und mit zur Regulierung des pH und pO_2 dient. Zusätzlich weist der Bioreaktor B 14 einen Magnetührer 64 zum Vermischen der Inhaltsstoffe auf. Eine Leitung 68 mit einem Überdruckventil dient zum Druckausgleich und führt in das Abluftsicherheitsgefäß 70 über einen Hohlfaserfilter 84, in dem eventuell vorhandene Viren zurückgehalten werden. Der Bioreaktor B 14 ist mit dem ersten Retentatbehälter 26 der ersten Filtrationsanordnung über eine Leitung 22, die mit einem Photometer 24 und einer Rückwuchsfalle ausgerüstet ist, verbunden, der wiederum über eine Leitung 78 mit einem daran vorhandenen Hohlfaserfilter 86 mit dem

Abluftsicherheitsgefäß 70 zum Druckausgleich verbunden ist. Retentat aus dem ersten Retentatbehälter 26 wird über die Leitung 36, die mit einer Rückwuchsfalle ausgerüstet ist, abgezogen. Aus dem ersten Retentatbehälter 26 wird über eine Leitung 28, die mit einem Photometer 30 ausgerüstet ist, Suspension in den ersten Filter 32 geleitet, und daraus das Retentat über die Leitung 34 in den ersten Retentatbehälter 26 zurückgeführt und das Filtrat über die Leitung 38, die mit einer Rückwuchsfalle ausgerüstet ist, in den zweiten Retentatbehälter 40 eingeleitet, der wiederum mit einer Druckausgleichsleitung 80 versehen ist, die über einen Hohlfilter 86 in das Abluftsicherheitsgefäß 70 mündet. Weiter ist der zweite Retentatbehälter 40 mit einer Leitung 50 versehen, die eine Rückwuchsfalle enthält und über die Viruskonzentrat abgezogen wird. Aus dem zweiten Retentatbehälter 40 wird über eine Leitung 42, die mit einer Pumpe 44 versehen ist, Suspension in die Filtrationseinrichtung 46 geführt, deren Retentat über die Leitung 48 in den zweiten Retentatbehälter 40 zurückgeführt wird, und deren Filtrat über die Leitung 54, die mit einer Rückflußfalle ausgestattet ist, abgezogen wird. Aus den Waschflüssigkeitsbehältern 76 kann ebenfalls rechnergesteuert über Leitungen 72, die mit Rückflußfallen ausgestattet sind und mit einer Pumpe 74 versehen sind, Waschflüssigkeit in die Retentatbehälter 26, 40 zugeleitet werden.

Die Steuerung der Zu- und Ableitungen zu und aus den verschiedenen Teilen der Vorrichtung wird mit Hilfe eines Prozeßrechners 56 durchgeführt.

Das folgende Beispiel soll die Erfindung weiter erläutern.

B e i s p i e l 1

Herstellung von BHK 21 Klon 13 Zellen in kontinuierlicher Suspensionskultur.

Die Anzucht der Zellen BHK 21 Klon 13 (ECACC Nr. 84100531 (zu beziehen durch Flow Laboratories Meckenheim)) kann sowohl in Monolayer- als auch in Rollerflaschen erfolgen. Zur Inokulation müssen im Fermenter mindestens 8×10^4 Zellen pro ml vorhanden sein, um ein schnelles Anwachsen der Kultur zu gewährleisten. Die Verdopplungszeit der BHK 21 Klon 13 Zellen betrug 24 Stunden. Mit der kontinuierlichen Zellgewinnung konnte nach 3 Tagen begonnen werden, sobald die Zellzahl mindestens 4×10^5 pro ml betrug. Die Mediumzugabe (9,538 g/l MEM (minimal ess. media) mit Earl's Spinnersalzen, 2,2 g/l NaHCO_3 , 10,0 ml/l MEM-Vitaminlösung, 10,0 ml/l nicht essentielle Aminosäuren, 10,0 %/l foetales Kälberserum, über Hohlfaserbündel, die direkt an den Bioreaktor angeschlossen sind, steril filtriert) betrug zum Fermentationsbeginn 240 ml pro Tag, das entspricht einer Verdünnung von 1:12,5 und konnte proportional zum Wachstum bis 1500 ml pro Tag gesteigert werden (1:2). Die Regulierung erfolgte über ein eingebautes Photometer. Die Zellen wuchsen ohne Mikrocarrier. Das Reaktionsvolumen des Bioreaktors A betrug 4 l, das Flüssigkeitsvolumen 3 l. Die Reaktionstemperatur war 37°C, die Rührgeschwindigkeit 150 U/min, der pH-Wert wurde auf 7,0 und der pO_2 auf 45% O_2 einer luftkalibrierten Lösung eingestellt. Der Gasgrundstrom betrug hierbei 4,5 l/min. Als Vordruck wurden 40 mbar N_2 , 20 mbar O_2 und 30 mbar CO_2 sowie Luft ohne Regelung eingesetzt. Als Geräte wurden im Beispiel die Folgenden eingesetzt:

| | | |
|-------------------------------|---|---------------|
| Mediumzugabe: | Pumpe IV | Hersteller: |
| | Pumpe III | BCC (By-pass) |
| | | BCC |
| Temperaturregelung: | Modul TEM | BCC |
| Temperaturfühler: | PT 100 | Lemo FGG. IB |
| Externes Heizgerät: | Kälte-Umwälz- Bad-Thermostat KT 2 Typ 001-3973 | Haake |
| Internes Heizgerät: | Temperierkorb eigene Entwicklung | BCC / IBT |
| Rührung: | Modul SPE | BCC |
| Interner Antrieb: | im Gefäßdeckel fest verankert Magnetrührstab mit aufgesetzten Rührpropellern | |
| Externer Antrieb: | im Versorgungsgehäuse fest instal- lierter Magnetrührer | |
| pH-Regulierung: | Modul PH | BCC |
| Elektrode: | pH-Elektrode autoklavierbar pH-Bereich 0 bis 12 Typ 465-36-90-K9 | Ingold |
| pO ₂ -Regulierung: | Modul PO ₂ | BCC |
| Elektrode: | pO ₂ -Elektrode autoklavierbar Typ 7455 / 322756702 | Ingold |
| Gasversorgung: | | |
| Version I: | -Durchflußregelventile Meßrohr FD-I/8-08-G-5/m Fischer & Porter -Magnetventile Oliven 5 mm Ø -Gasmischgefäß | BCC |
| Version 2: | -Massendurchflußregler -Gasmischgefäß | MKS BCC |

15

| | | |
|--|---------------------------------------|-----------------------|
| Druckminderer: | Typ Nr. D 142/O ₃ | Dräger |
| Preßluft: | kontinuierlicher Luftstrom | |
| Hohlfaser zur Belüftung: | Accurel (R) PP Typ S 6/2 hydrophob | Enka-Membrana Akzo |
| Porengröße: | max 0,54 µm | |
| Wicklung: | senkrecht zum Flüssigkeitsspiegel | |
| Bedarf: | 3 m/l 1 Flüssigkeit | |
| Niveauregulierung: | Modul NIV | BCC |
| Elektroden: | autoklavierbar Teflonüberzug | BCC |
| Dichtebestimmung der Zell-Suspension: | Durchflußphotometer | BCC |

B e i s p i e l 2

Kontinuierliche Produktion von ND (Newcastle Disease)
Vakzine auf BHK 21 Zellen

Als Zellerhaltungsmedium wurde folgendes Medium verwendet:

| | |
|--------------------------|-----------|
| MEM (minimal ess. media) | |
| mit Earl's Spinnersalzen | 9,543 g/l |
| NaHCO ₃ | 2,2 g/l |
| MEM-Vitaminlösung | 10,0 ml/l |
| fötäles Kälberserum | 2,0 %/l |

Sterilisation des Mediums erfolgt durch Filtration über
direkt an den Bioreaktor angeschlossene Hohlfaserbündel.

Virusinoculum für den Bioreaktor B (Virus)

Der Virusfermenter wurde mit einer auf BHK Monolayer gezüchteten Kultur, die in 100 ml $7,1 \times 10^7$ ID Virus enthält, beimpft. Die Infektion der Monolayerkultur war zwei Tage vor der ersten Frischzellenzugabe in den Bioreaktor erfolgt. Der Zellrasen der Monolayerkultur durfte bis zu diesem Zeitpunkt der Beimpfung des Virusfermenters noch keine Zellysis aufweisen. Die eigentliche Freisetzung der Viren sollte im Fermenter erfolgen und zwar zum Zeitpunkt der Zellzugabe aus dem Zellreaktor (Reaktor A).

Zur Inokulation aus Bioreaktor A wurden 6×10^6 Zellen/ml in einer Durchflußmenge von 50 bis 100 ml pro Stunde (je nach Zellwachstum) von Bioreaktor A zu Reaktor B bei $3,0 \times 10^8$ bis $6,0 \times 10^8$ Zellen pro Stunde in Reaktor B zugegeben. Das Reaktorvolumen des Bioreaktor B war ebenfalls 4 l, das Flüssigkeitsvolumen 3 l, die Temperatur 37°C , die Rührgeschwindigkeit 150 Umdrehungen pro Minute, der pH-Wert wurde auf 7,0, der pO_2 -Wert auf 40,0 % O_2 in einer luftkalibrierten Lösung eingestellt. Der Gasgrundstrom betrug 4,0 l pro Minute, als Vordruck wurde 40 mbar N_2 , 20 mbar O_2 , 30 mbar CO_2 und Luft ohne Regelung des Vordrucks eingesetzt. Die Mediumzugabe betrug 2 l pro Tag und die Zellzugabe durchschnittlich $1,2 \times 10^{10}$ Zellen pro Tag. Die Virus-ernte ergab $1,0 \times 10^7$ ID/ml = $2,0 \times 10^{10}$ ID/Tag, wobei die Ernte erfolgte, wenn 80% der Zellen zerstört waren. Die Geräteausstattung des Bioreaktors 2 entsprach der des Bioreaktors I, jedoch mit folgenden Besonderheiten:

Regulierung der Mediumzugabe in Verbindung mit dem
Zellzulauf aus dem Reaktor I.

Die im Reaktor I eingebaute Niveauregulierung öffnete zeitverzögert zwei Magnetventile:

Magnetventil 1: Zellfluß zu Reaktor II wurde ermöglicht

Magnetventil 2: Magnetventil 1 war geschlossen;

zum Freispülen der Zuleitung von Zellen
wurde der Mediumzulauf für Reaktor II
geöffnet;

Öffnungszeit 5 bis 10 Sekunden.

Abluftentsorgung:

| | | |
|---|----------------------|-----------|
| | | Firmen |
| Fritte: | 0,4 µm Porengröße | BCC |
| NaOH-Bad: | 2%iges Laugenbad | |
| Filter: | Schwebstoffklasse S | Enka Akzo |
| | Porengröße 0,05 µm | |
| | hydrophob | |
| Bestimmung des cyto- pathischen Effekts zur Ermittlung des Virus- titers: | Durchfluß-Photometer | BCC |

Die Abscheidung von Zellresten erfolgte über Zellfilter mit 0,45 µm Porengröße (Akzo MD 020 P2N) in der Filtrationsanordnung 1 und über Virusfilter 50.000 NMGG (Akzo V 100 I) in der Filtrationsanordnung 2. Zahnradpumpen,

Niveauregulierung und Magnetventile stammten von der Firma BCC. Als übergeordnete Koordination der Bioreaktoren und Filter wurde der industrielle Leitrechner FLS1 mit angepaßter Software der Firma Münzer und Diehl verwendet. Das Leitrechnersystem kontrollierte durch Dichtebestimmung das Zellwachstum im Bioreaktor A und die Virusvermehrung über den cytopathischen (lytischen Effekt in Bioreaktor B und steuert den Nährbodenzulauf zu Bioreaktor A und Zellabgabe von Bioreaktor B optimal. Die variabel drehenden Pumpen des Filtrationssystems wurden über den Rechner so gesteuert, daß alles anfallende Material sofort aufgearbeitet wurde.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Herstellung von Virus oder viralem Antigen durch Kultur auf tierischen Zellen in Nährmedium-Suspension, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß man in einem ersten Bioreaktor A die tierischen Zellen unter kontinuierlicher Nährmediumzugabe in Suspension kultiviert, nach Erreichen einer bestimmten Zellkonzentration die Zellsuspension in einen zweiten Bioreaktor B kontinuierlich überführt und dort als Nährboden für die Viruszüchtung unter kontinuierlicher Zugabe eines Erhaltungsmediums verwendet, nach Erzeugung einer bestimmten Menge an Virus in einer ersten Filtrationsanordnung Zellen und Zellreste von der virushaltigen Nährmediumsuspension kontinuierlich abtrennt, das Retentat verwirft, im Filtrat in einer zweiten Filtrationsanordnung Virus oder virales Antigen von der Nährmediumsuspension kontinuierlich trennt und dabei aufkonzentriert und das Nährmedium verwirft.
2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß die Zellen nach Erreichen einer Konzentration von mindestens 4×10^5 Zellen pro ml kontinuierlich in den Bioreaktor B überführt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß die Filtrationsschritte kontinuierlich erfolgen, sobald im Bioreaktor B mindestens 80 % der Zellen lysiert sind.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man bei der Züchtung von Viren, die keinen
cytopathischen Effekt ausüben, nach einer vorbe-
stimmten Zeit Zellsuspension aus dem Bioreaktor B
abzieht, die Zellen durch Ultraschallbehandlung
zerstört und die Suspension dann in die erste Fil-
trationsanordnung überführt.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die Retentate der ersten Filtrationsanordnung
und/oder zweiten Filtrationsanordnung mit einer
Waschflüssigkeit gewaschen werden, die als Filtrat
in der zweiten Filtrationsanordnung dem Viruspro-
dukt entzogen und verworfen wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die Konzentration der Zellen durch photometrische
Messung bestimmt wird und der Zulauf von Bioreaktor
A zu Bioreaktor B, vom Bioreaktor B in die erste
Filtrationsanordnung sowie die Zugabe von Waschflüs-
sigkeit zu den Retentaten der ersten und zweiten
Filtrationsanordnung über einen Rechner gesteuert
wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß in den Filtrationsanordnungen Hohlfaserbündel
als Filter im Überstrom verwendet werden.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß das Nährmedium vor der Zugabe zu Bioreaktor A,

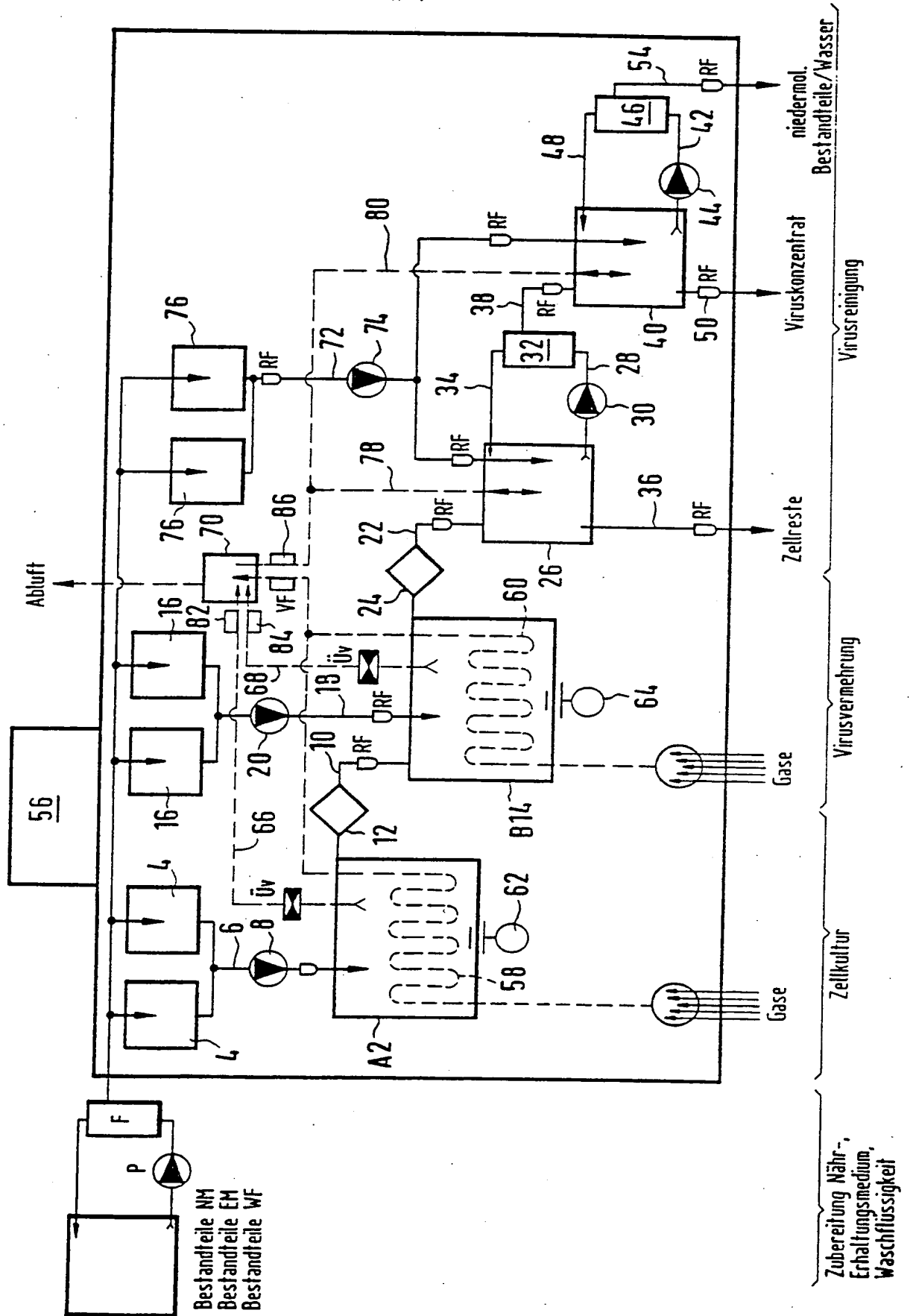
das Erhaltungsmedium vor der Zugabe zu Bioreaktor B sowie die Waschflüssigkeit vor Zugabe zu den Retentaten der Filtrationsanordnung tangential über Hohlfaserbündel im Überstrom steril filtriert wird.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß der pH und pO_2 in den Bioreaktoren über Begasung über Hohlfasermembranen gesteuert werden.
10. Verfahren nach Anspruch 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die zur pH- und pO_2 -Regulierung verwendeten Gase in einem Gasmischgefäß rechnergesteuert gemischt und gemeinsam durch nur ein Hohlfasersystem eingeleitet werden.
11. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 bis 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß ein Bioreaktor A (2), der über eine Leitung (6) mit Nährmedium-Vorratsbehältern (4) und über eine Leitung (10), welche mit einem Photometer (12) ausgerüstet ist, mit einem Bioreaktor B (14) verbunden ist, der wiederum über eine Leitung (18) mit Erhaltungsmediumbehältern (16) und weiter über eine Leitung (22) mit einem ersten Retentatbehälter (26) verbunden ist, aus dem die Zell-Virus-Suspension über eine Leitung (28) über eine erste Filtrationseinrichtung (32) geleitet wird, deren Retentat über eine Leitung (34) zurück in den ersten Retentatbehälter (26) geführt wird und aus dem ersten

Retentatbehälter (26) über eine Leitung (36) aus dem System abgezogen wird, und deren Filtrat über eine Leitung (38) in einen zweiten Retentatbehälter (40) geführt wird, der über eine Leitung (42) mit einer zweiten Filtrationseinrichtung (46) verbunden ist, deren Retentat über eine Leitung (48) zurück in den zweiten Retentatbehälter (40) geführt wird und aus dem System über eine Leitung (50) abgezogen wird und deren Filtrat über eine Leitung (54) abgezogen wird, wobei das Photometer (12) mit einem Rechner-gesteuerten Kontrollsystem (56) verbunden sind.

12. Vorrichtung nach Anspruch 11, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Leitung (22) ebenfalls mit einem Photometer (24) ausgerüstet ist, das mit dem Kontrollsystem (56) verbunden ist.
13. Vorrichtung nach Anspruch 11, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Leitung (22) mit einem Sammelgefäß, das eine Ultraschallquelle enthält, und dahinter einer Pumpe ausgerüstet ist.
14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 13, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Leitungen (6, 18, 28, 42) mit Pumpen (8, 20, 30, 44) ausgerüstet sind.
15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 14, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Bioreaktoren A und B (2, 14) mit Hohlfasermembranen (58, 60) versehen sind, über die der pH-Wert und pO_2 -Gehalt der Zellsuspensionen durch Zugabe von Gasen reguliert werden.

16. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Bioreaktoren A und B (2, 14) mit Magnetrührern (62, 64) ausgestattet sind.
17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Leitungen (6, 10, 18, 22, 36, 38, 50 und 54) mit Rückwuchsfallen ausgestattet sind.
18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Bioreaktoren A und B (2, 14) mit Leitungen (66, 68) mit Überdruckventilen ausgestattet sind, die in ein Abluftsicherheitsgefäß (70) münden.
19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß eine Leitung (72) mit einer Pumpe (74) vorhanden ist, über die in den ersten Retentatbehälter (26) und den zweiten Retentatbehälter (40) eine Waschflüssigkeit aus Waschflüssigkeitsbehältern (76) eingeführt werden kann.
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß Druckausgleichsleitungen (78, 80) an den Retentatbehältern (26, 40) vorhanden sind, die in das Abluftsicherheitsgefäß (70) münden.
21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Zuleitungen (66, 68, 78, 80) zum Abluftsicherheitsgefäß mit Hohlfaserfiltern (82, 84, 86) ausgerüstet sind.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 89/00245

| I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="font-family: monospace; font-size: 1.2em;">Int. Cl.⁴ C 12 N 7/02, C 12 M 3/00</div> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|-------------------------------------|---|--|-------------------------------------|--------------------------|---|---------------------------------|------------------------|---|--|---|--|-----|---|--|---|
| II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; font-size: 0.8em;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 25%; border-bottom: 1px solid black; font-size: 0.8em;">Classification System</td> <td style="border-bottom: 1px solid black; font-size: 0.8em;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="height: 40px; vertical-align: top; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">Int. Cl.⁴</td> <td style="height: 40px; vertical-align: top; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">C 12 N, C 12 M</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; font-size: 0.8em;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸</div> | | | Classification System | Classification Symbols | Int. Cl. ⁴ | C 12 N, C 12 M | | | | | | | | | | | |
| Classification System | Classification Symbols | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Int. Cl. ⁴ | C 12 N, C 12 M | | | | | | | | | | | | | | | | |
| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: 0.8em;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category ¹⁰</th> <th style="width: 70%;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 20%;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">Y</td> <td>US, A, 4673650 (W.I. BRADEN) 16 June 1987, see claims; figures --</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1,4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">A</td> <td>DE, B, 1069332 (BIOGENA) 19 November 1959 --</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">Y</td> <td>FR, A, 2073366 (GLAXO LABORATORIES LTD) 1 October 1971, see claims 1,3,12; page 4, lines 35,36; page 5, lines 2-14 --</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1,4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">A</td> <td>FR, A, 2139858 (MERCK & CO.) 12 January 1973, see claims -----</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1</td> </tr> </tbody> </table> | | | Category ¹⁰ | Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹² | Relevant to Claim No. ¹³ | Y | US, A, 4673650 (W.I. BRADEN) 16 June 1987, see claims; figures -- | 1,4 | A | DE, B, 1069332 (BIOGENA) 19 November 1959 -- | | Y | FR, A, 2073366 (GLAXO LABORATORIES LTD) 1 October 1971, see claims 1,3,12; page 4, lines 35,36; page 5, lines 2-14 -- | 1,4 | A | FR, A, 2139858 (MERCK & CO.) 12 January 1973, see claims ----- | 1 |
| Category ¹⁰ | Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹² | Relevant to Claim No. ¹³ | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | US, A, 4673650 (W.I. BRADEN) 16 June 1987, see claims; figures -- | 1,4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | DE, B, 1069332 (BIOGENA) 19 November 1959 -- | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | FR, A, 2073366 (GLAXO LABORATORIES LTD) 1 October 1971, see claims 1,3,12; page 4, lines 35,36; page 5, lines 2-14 -- | 1,4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | FR, A, 2139858 (MERCK & CO.) 12 January 1973, see claims ----- | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <div style="font-size: 0.8em;"> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div> </div> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IV. CERTIFICATION <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; font-size: 0.8em;">Date of the Actual Completion of the International Search</td> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; font-size: 0.8em;">Date of Mailing of this International Search Report</td> </tr> <tr> <td style="height: 30px; vertical-align: bottom; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">12 July 1989 (12.07.89)</td> <td style="height: 30px; vertical-align: bottom; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">7 August 1989 (07.08.89)</td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black; font-size: 0.8em;">International Searching Authority</td> <td style="border-bottom: 1px solid black; font-size: 0.8em;">Signature of Authorized Officer</td> </tr> <tr> <td style="height: 30px; vertical-align: bottom; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">European Patent Office</td> <td></td> </tr> </table> | | | Date of the Actual Completion of the International Search | Date of Mailing of this International Search Report | 12 July 1989 (12.07.89) | 7 August 1989 (07.08.89) | International Searching Authority | Signature of Authorized Officer | European Patent Office | | | | | | | | |
| Date of the Actual Completion of the International Search | Date of Mailing of this International Search Report | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 July 1989 (12.07.89) | 7 August 1989 (07.08.89) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| International Searching Authority | Signature of Authorized Officer | | | | | | | | | | | | | | | | |
| European Patent Office | | | | | | | | | | | | | | | | | |

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

EP 8900245

SA 27203

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 31/07/89. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US-A- 4673650 | 16-06-87 | None | |
| DE-B- 1069332 | | None | |
| FR-A- 2073366 | 01-10-71 | BE-A- 758977 | 17-05-71 |
| | | DE-A- 2056294 | 15-07-71 |
| | | GB-A- 1331933 | 26-09-73 |
| | | NL-A- 7016747 | 19-05-71 |
| FR-A- 2139858 | 12-01-73 | AU-A- 4174172 | 08-11-73 |
| | | BE-A- 783015 | 06-11-72 |
| | | CA-A- 977694 | 11-11-75 |
| | | DE-A- 2221911 | 23-11-72 |
| | | GB-A- 1356741 | 12-06-74 |
| | | NL-A- 7205435 | 07-11-72 |

EP 0 FORM P479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

INTERNATIONALER RESEARCH-BERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 89/00245

| I. KLASSEFIZKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶ Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int. Cl. 4: C 12 N 7/02, C 12 M 3/00 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|----------------------------------|--|--|--|--|--|-----|---|--|--|---|--|-----|---|---|---|
| II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE <div style="text-align: right; margin-right: 50px;">Recherchierter Mindestprüfstoff⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; padding: 5px;">Klassifikationssystem</td> <td style="padding: 5px;">Klassifikationssymbole</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int. Cl. 4</td> <td style="padding: 5px;">C 12 N, C 12 M</td> </tr> </table> <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸</p> | | | Klassifikationssystem | Klassifikationssymbole | Int. Cl. 4 | C 12 N, C 12 M | | | | | | | | | | | |
| Klassifikationssystem | Klassifikationssymbole | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Int. Cl. 4 | C 12 N, C 12 M | | | | | | | | | | | | | | | | |
| III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Art*</th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Kennzeichnung der Veröffentlichung¹¹, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile¹²</th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Betr. Anspruch Nr. ¹³</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">US, A, 4673650 (W.I. BRADEN) 16. Juni 1987, siehe Ansprüche; Figuren --</td> <td style="text-align: center; padding: 5px;">1,4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">DE, B, 1069332 (BIOGENA) 19. November 1959 --</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">FR, A, 2073366 (GLAXO LABORATORIES LTD) 1. Oktober 1971, siehe Ansprüche 1,3,12; Seite 4, Zeilen 35,36; Seite 5, Zeilen 2-14 --</td> <td style="text-align: center; padding: 5px;">1,4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">FR, A, 2139858 (MERCK & CO.) 12. Januar 1973, siehe Ansprüche ----</td> <td style="text-align: center; padding: 5px;">1</td> </tr> </table> | | | Art* | Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹² | Betr. Anspruch Nr. ¹³ | Y | US, A, 4673650 (W.I. BRADEN) 16. Juni 1987, siehe Ansprüche; Figuren -- | 1,4 | A | DE, B, 1069332 (BIOGENA) 19. November 1959 -- | | Y | FR, A, 2073366 (GLAXO LABORATORIES LTD) 1. Oktober 1971, siehe Ansprüche 1,3,12; Seite 4, Zeilen 35,36; Seite 5, Zeilen 2-14 -- | 1,4 | A | FR, A, 2139858 (MERCK & CO.) 12. Januar 1973, siehe Ansprüche ---- | 1 |
| Art* | Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹² | Betr. Anspruch Nr. ¹³ | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | US, A, 4673650 (W.I. BRADEN) 16. Juni 1987, siehe Ansprüche; Figuren -- | 1,4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | DE, B, 1069332 (BIOGENA) 19. November 1959 -- | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | FR, A, 2073366 (GLAXO LABORATORIES LTD) 1. Oktober 1971, siehe Ansprüche 1,3,12; Seite 4, Zeilen 35,36; Seite 5, Zeilen 2-14 -- | 1,4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | FR, A, 2139858 (MERCK & CO.) 12. Januar 1973, siehe Ansprüche ---- | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IV. BESCHEINIGUNG <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 12. Juli 1989</td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 07.08.1989</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt</td> <td style="padding: 5px;">Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten M. VAN MOL </td> </tr> </table> | | | Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 12. Juli 1989 | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 07.08.1989 | Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt | Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten M. VAN MOL | | | | | | | | | | | |
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 12. Juli 1989 | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 07.08.1989 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt | Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten M. VAN MOL | | | | | | | | | | | | | | | | |

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 8900245
SA 27203

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 31/07/89
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| US-A- 4673650 | 16-06-87 | Keine | |
| DE-B- 1069332 | | Keine | |
| FR-A- 2073366 | 01-10-71 | BE-A- 758977 | 17-05-71 |
| | | DE-A- 2056294 | 15-07-71 |
| | | GB-A- 1331933 | 26-09-73 |
| | | NL-A- 7016747 | 19-05-71 |
| FR-A- 2139858 | 12-01-73 | AU-A- 4174172 | 08-11-73 |
| | | BE-A- 783015 | 06-11-72 |
| | | CA-A- 977694 | 11-11-75 |
| | | DE-A- 2221911 | 23-11-72 |
| | | GB-A- 1356741 | 12-06-74 |
| | | NL-A- 7205435 | 07-11-72 |

EPO FORM P0473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82